

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

translation obtained  
#150 attachment  
09/8/11/62

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-43445

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月16日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
A 6 1 K 38/00	A D U	A 6 1 K 37/02
// C 0 7 K 7/06	Z N A	C 0 7 K 7/06
7/08		7/08

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平9-200591

(22) 出願日 平成9年(1997) 7月25日

(71) 出願人 000006127

森永乳業株式会社

東京都港区芝5丁目33番1号

(72) 発明者 島 清彦

栃木県河内郡南河内町祇園2丁目11番地6号

(72) 発明者 服井 康仁

栃木県河内郡南河内町祇園3丁目1番地3号 E102

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 抗腫瘍剤

(57) 【要約】

【課題】 副作用が極めて少なく、かつ熱にも安定であり、少量で腫瘍細胞に対して選択的に抗腫瘍効果を有する抗腫瘍剤を提供する。

【解決手段】 配列番号1のアミノ酸配列を含む5から20個のアミノ酸からなるペプチド、このペプチドの誘導体、このペプチドもしくは誘導体の薬理学的に許容される塩類、またはこれらの混合物を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のアミノ酸配列を含む5から20個のアミノ酸からなるペプチド、このペプチドの誘導体、このペプチドもしくは誘導体の薬理的に許容される塩類、またはこれらの混合物を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【請求項2】 有効成分を、最終組成物1g当たり少なくとも5mg含有する請求項1の抗腫瘍剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、抗腫瘍剤に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、腫瘍細胞の増殖抑制作用、制癌作用、癌転移抑制作用および血管新生抑制作用等を有し、悪性腫瘍の治療に有効な新しい抗腫瘍剤に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、悪性腫瘍の治療は、早期発見および外科的切除が主要な方法とされているが、悪性腫瘍が外科的に切除し難い部位に発生した場合、または原発部位以外の部位へ転移した場合および浸潤が惹起された場合には、患部への放射線照射、抗腫瘍剤の定期的投与等による治療法が行われている。

【0003】抗腫瘍剤の定期的投与による治療法は、薬剤の

- 1) 免疫賦活作用
- 2) 代謝拮抗作用
- 3) 腫瘍細胞を直接殺傷する作用

をそれぞれ利用する治療法に大別することができる。

【0004】前記2)および3)の作用を利用する治療法には、多くの化学的に合成した薬剤が使用されている。しかしながら、これらの薬剤は、抗腫瘍作用が強い反面、腫瘍細胞のみならず、正常細胞にも毒性を発揮するという副作用も有している。また、固形癌に有効な薬剤が少ないこと、これらの薬剤の使用により多剤耐性が惹起されることも指摘されている。(井村裕夫編、「がんのバイオサイエンス4がんの新しい診断と治療」、第10ページ、東京大学出版会、1991年)。

【0005】一方、前記1)の作用を利用する治療法は、生体の免疫系を賦活化し、腫瘍に対する免疫機能を高めて治療する方法であり、腫瘍に対する生体反応を増強する物質BRM(biological response modifier)が用いられている。すなわち、BRMとしてインターロイキン、サイトカイン、担子菌成分(例えば、シゾフィラン、レンチナン等)等を投与し、抗腫瘍作用を有するリンパ球およびマクロファージを活性化すること、抗腫瘍作用を有する腫瘍壊死因子(TNF)を投与すること等が試みられており、前記2)または3)の作用を有する化学合成薬剤との併用も臨床研究されている(矢田純一著、「医系免疫学」、第325ページ、中外医学社、1989年)。

【0006】なお、従来の抗腫瘍剤における有効成分としては、核酸または蛋白質をアルキル化して不活化させたアルキル化剤[例えば、シクロホスファミド等。キャンサー・リサーチ(Cancer Research)、第21巻、第1412ページ、1961年]、核酸合成の拮抗阻害剤[例えば、5-フルオロウラシル等。キャンサー(Cancer)、第45巻、第1129ページ、1980年]、一部の抗生物質[例えば、アクチノマイシンD等。ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of Immunology)、第145巻、第1859ページ、1990年]等が知られている。

【0007】また、抗腫瘍作用を有するポリペプチドとしては、ヒトインターフェロン $\alpha$ ポリペプチド(特開平5-320200号公報)、ヒト腫瘍壊死因子(TNF)またはその変換体の一部からなるポリペプチド(特開平5-271290号公報、特開平5-271289号公報、特開平5-255393号公報、特開平5-271287号公報、特開平4-368398号公報、特開平4-368397号公報、特開平4-327599号公報、特開平3-180194号公報、特開平3-180193号公報、特開平3-98587号公報、特開平3-65196号公報、特開平3-65195号公報、特開平3-61495号公報、特開平3-30693号公報、特開平2-72122号公報、特開平2-255096号公報、特開平2-177896号公報、特開平2-163094号公報、特開平2-145188号公報、特開平2-86793号公報、特開平1-277488号公報、特開平1-85095号公報、特開平1-85094号公報、特開平1-47393号公報、特開平1-30596号公報、特開平1-30595号公報、特開平2-9389号公報、特開昭63-279799号公報、特開昭63-267290号公報、特開昭63-198996号公報、特開昭63-141999号公報、特開昭63-32486号公報、特開昭62-272991号公報、特開昭62-248498号公報、特開昭62-48632号公報および特開昭61-280437号公報)、茜草から抽出した特定のアミノ酸配列を有する環状ペプチド化合物(特開平5-262794号公報及び特開平5-32698号公報)、ヒトインターロイキン2活性を有するポリペプチド(特表平5-502876号公報)、ヒトインターロイキン1 $\alpha$ ポリペプチド(特開平4-330282号公報)、下垂体からの性腺刺激ホルモンの放出を制御し抗新生物活性を有するLHRH類似体(特開平4-224600号公報)、ソマトスタチン類似体(特開平6-41194号公報)、形質転換性成長因子 $\beta$ -2またはその同族体の一部からなるポリペプチド(特開平1-63395号公報)、植物種実抽出蛋白成分から得たポリペプチド(特開平1-75430号公報)、I型インターフェロンペプチド(特開昭61-181381号公報)、ヒト

組織球形リンパ腫由来細胞株の産生するポリペプチド（特開昭61-280431号公報）、ストレプトマイセス属の微生物が産生するポリペプチド（特開昭61-271991号公報）、ヒトインターロイキン2ポリペプチド誘導体（特開昭61-225199号公報）、サフラマイシンA誘導体（特開昭61-58593号公報）、ヒト免疫インターフェロン（特開昭58-189197号公報）、ヒト線維芽細胞インターフェロン（特開昭57-140793号公報）、少なくとも2-アミノ-3-グアニド-プロピオン酸を含むポリペプチド（特開昭56-147796号公報）等が知られている。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】前記のとおり、従来から、抗腫瘍活性を示すポリペプチド等は知られているが、これらのポリペプチド等の場合には、その抗原性、熱に対する安定性および化学合成の困難性等の問題を有していた。従って、抗原性等の副作用を示さず、かつ熱にも安定であり、特に、腫瘍細胞に選択的に作用し、周囲の組織に有害な炎症反応を惹起しない抗腫瘍剤が待望されていた。また、安価であり、化学合成による供給が可能であり、実用性が高い低分子の抗腫瘍活性を有するペプチドの開発が望まれていた。

【0009】この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、副作用が極めて少なく、かつ熱にも安定であり、腫瘍細胞に選択的に作用するペプチドを含む抗腫瘍剤を提供することを目的としている。また、この発明は、安価で、しかも化学的合成による供給が可能であり、実用性が高い抗腫瘍剤を提供することを目的としている。

#### 【0010】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記の課題を解決するものとして、配列番号1のアミノ酸配列を含む5から20個のアミノ酸からなるペプチド、このペプチドの誘導体、このペプチドもしくは誘導体の薬理学的に許容される塩類、またはこれらの混合物を有効成分として含有する抗腫瘍剤を提供する。

【0011】また、この発明の抗腫瘍剤においては、有効成分を、最終組成物1g当たり少なくとも5mg含有することを望ましい態様としてもいる。

#### 【0012】

【発明の実施の形態】この発明の抗腫瘍剤の有効成分であるペプチド（以下、抗腫瘍性ペプチドと記載する。）は、配列番号1に記載の5残基のアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号1のアミノ酸配列を含む20残基までのペプチドである。これらの抗腫瘍性ペプチドは、固相法、液相法等の公知の方法により、次のとおり化学的に合成することができる。

【0013】固相法による場合は、ペプチド合成用固相樹脂を使用して、アミノ酸ブロックを順次縮合させてペ

プチド鎖を延長し、所望の抗腫瘍性ペプチドを合成する。アミノ酸ブロックとして、N末端および側鎖の反応性基を9-フルオレニルメトキシカルボニル（以下、Fmocと略記する。）基等の保護基で保護したアミノ酸誘導体を使用し、C末端側からの縮合反応およびN末端側の脱保護基反応を反復して目的のペプチド鎖を合成する。次いで、N末端および側鎖の反応性基が保護されたペプチドを樹脂から切断して取り出し、脱保護反応を行うことにより、目的とする抗腫瘍性ペプチドを得ることができる。

【0014】なお、以上の操作を機械化、自動化したペプチド自動合成装置（例えば、パーキン・エルマー社製のModel 433A等）を使用して実施することもできる。一方、液相法による場合は、N末端、C末端、および側鎖の反応性基を保護基で保護したアミノ酸誘導体をアミノ酸ブロックとし、これを使用して縮合反応、およびN末端またはC末端の脱保護基反応を反復して目的の抗腫瘍性ペプチド鎖を合成する。さらに、液相法においてはC末端側、またはN末端側から順次ペプチド鎖を延長する逐次鎖延長法に代えて、目的とするペプチド鎖を適当なフラグメントに分割し、各フラグメント鎖を合成した後、各フラグメント鎖を縮合させて目的とするペプチド鎖を合成するフラグメント法を適用することもできる。

【0015】この発明の抗腫瘍剤の有効成分である抗腫瘍性ペプチドの誘導体は、前記のとおりの方法によって化学合成した抗腫瘍性ペプチドの一部置換体、付加化合物等の誘導体であり、C末端がアミド化またはアシル化された抗腫瘍性ペプチドの誘導体を例示することができる。例えば、C末端がアミド化された抗腫瘍性ペプチドの誘導体を固相法により合成する場合には、前記のとおり、N末端および側鎖の反応性基が保護されたペプチドを樹脂から切断して取り出し、このペプチドのC末端のアミド化を行い、さらに保護反応を行うことによって、目的とする抗腫瘍性ペプチドの誘導体を得ることができる。

【0016】また、C末端がアミド化されたペプチド誘導体を合成する場合には、通常の固相樹脂の代わりにC末端アミドペプチド合成用固相樹脂（例えば、パーキン・エルマー（Perkin Elmer）社製のFmocアミドレジジン等）を使用することもできる。この場合には、保護基の選択によって脱樹脂および脱保護を同時に実施できるので便利である。

【0017】この発明の抗腫瘍の有効成分である抗腫瘍性ペプチドまたはその誘導体の薬理学的に許容される塩類は無毒性の塩であり、具体的には酸付加塩、金属錯体、カルボン酸塩等である。酸付加塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、りん酸塩、タンニン酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、アルギン酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、リンゴ酸塩、アスコ

ルビン酸塩、酒石酸塩等を例示することができる。また、金属錯体としては、例えば、亜鉛、鉄、カルシウム、マグネシウムまたはアルミニウム等の錯体を例示することができる。さらに、カルボン酸塩としては、例えば、アルカリ金属とのナトリウム塩、カリウム塩等、アルカリ土金属とのカルシウム塩、マグネシウム塩等、アンモニウム塩等を例示することができる。

【0018】この発明の抗腫瘍剤は、前記のとおり抗腫瘍性ペプチド、抗腫瘍性ペプチドの誘導体、抗腫瘍性ペプチドまたはその誘導体の薬理学的に許容される塩類（以下、これらをまとめて「ペプチド類」と記載することがある。）から選択された任意の1種の化合物または2種以上の混合物を有効成分として5mg/kg以上の濃度で含有させ、その他の成分とともに製剤化することができる。その他の成分としては、医薬製造分野で通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤の希釈剤、賦形剤等を例示することができる。

【0019】この発明の抗腫瘍剤は、一般的な医薬製剤の形態、例えば、静注、皮下注または経口によりヒトまたは動物に投与することができ、これらの投与経路および治療目的に応じて各種の剤形が選択可能である。その代表的なものとして錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）等を例示することができる。例えば、錠剤に成形する場合、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を適宜使用することができる。また、錠剤は必要に応じて通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸用被錠フィルムコーティング錠または二重錠、多層錠とすることもできる。

【0020】注射剤を調製する場合は、液剤、乳剤および懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であるのが好ましく、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリアルアルコール、ポリオキシ化イソステアリアルアルコール、ポリオキ

シエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を使用することができる。なお、この場合、等張性の溶液を調製するに充分な量の食塩、ブドウ糖、グリセリン等を含有させることも可能であり、また、溶解補助剤、緩衝剤、鎮痛剤等を配合することもできる。

【0021】これら各形態の医薬製剤には、さらに必要に応じて慣用される着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等を配合することができ、また、他の医薬品有効成分を含有させることもできる。さらに、この発明の抗腫瘍剤は、必要に応じて他の抗腫瘍剤、例えば、癌化学療法剤として公知の各種制癌剤と併用して使用することもでき、また、放射線療法と併用して使用することもできる。この結果、この発明の抗腫瘍剤は、優れた制癌効果も奏し得ることから、併用した他の制癌剤の効果を一層助長し、相乗効果を発揮させることができる。従って、併用した制癌剤の使用量を通常の使用量より少量とした場合でも、十分な癌治療効果が得られるので、併用する制癌剤の副作用を軽減することもできる。

【0022】この発明の抗腫瘍剤の有効投与量は皮下投与の場合、マウスによる試験結果から、少なくとも1mg/体重1kg/1日であることが判明した。また、この発明の抗腫瘍剤の有効成分であるペプチド類は、マウスを用いた静脈投与による急性毒性試験の結果、毒性が極めて低く、LD<sub>50</sub>は100mg/体重kg以上であり、ヒトまたは動物に対して安全に、かつ副作用が極めて少ない状態で使用することができる。

【0023】なお、この発明の抗腫瘍剤は、制癌剤、癌転移抑制剤または血管新生抑制剤としても有効である。次に、試験例を示してこの発明の効果を詳しく説明する。

#### 試験例

この試験は、この発明の抗腫瘍剤が腫瘍細胞の増殖抑制効果を有するか否かを調べるために行った。

#### (1) 試料の調製

実施例1と同一の方法により化学的に合成した配列番号1のアミノ酸配列を有する抗腫瘍性ペプチドを、生理食塩水（生理食塩注、大塚製薬社製）に0.3mg/mlの濃度で溶解し、60℃で24時間加熱し、のち冷却し、試料溶液として使用した。また、対照溶液として抗腫瘍性ペプチドを含まない生理食塩水を同様に処理して使用した。

#### (2) 試験方法

キリアジス（Kyriazis）らの方法〔アメリカン・ジャーナル・オブ・パソロジー（American Journal of Pathology）、第106巻、第250ページ、1982年〕に基づいて次のとおり試験を実施した。

【0024】ヒト赤芽球性白血病細胞（K562）をダルベッコリン酸緩衝液〔ジャーナル・オブ・エクスperimental Medicine〕、第99巻、第167～182ページ、1954

年]に $5 \times 10^6$  個/mlの割合で分散させ、この細胞分散液0.1mlを1週間予備飼育した5週令の雄ヌードマウス(Balb/c nu/nu、日本チャールスリバー社より購入)20匹の背部皮下に移植した。

【0025】移植したマウスを常法により4日間飼育し、各マウスにおける腫瘍の形成を確認し、無作為に1群10匹に分割し、1群に試料溶液、他の1群に对照溶液を、1日1回0.1mlの割合で毎日腫瘍内投与し、細胞移植7日後および10日後にノギスにより各腫瘍の長径および短径を測定し、腫瘍の容積を次式により算出した。

【0026】

腫瘍の容積(mm<sup>3</sup>) = 短径<sup>2</sup> × 長径 × 0.4

なお、この試験に使用したヒト赤芽球性白血病細胞(K562)は、公知のヒト白血病細胞株であり[ブラッド(Blood)、第45巻、第321~322ページ、1979年]、この細胞はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection:AT

CC)に、寄託番号ATCCNo. CCL-243として寄託されており、容易に入手可能である。

### (3) 試験結果

この試験の結果は、表1に示すとおりである。表1は、各群10匹の平均腫瘍面積を示している。表1から明らかとなり、この発明の抗腫瘍剤を含む試料溶液投与群は、对照溶液投与群に比較して腫瘍の容積が、7日後で約3/5であり、10日後では約1/2以下となった。この結果から、この発明の抗腫瘍剤は有意にK562細胞の増殖を抑制し、顕著な抗腫瘍効果を有することが確認された。また、60℃で24時間加熱後も抗腫瘍効果が認められたことから、この発明の抗腫瘍剤は熱に安定であることが判明した。

【0027】なお、他のペプチド類についても試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0028】

【表1】

腫瘍移植後 の日数	腫瘍の平均容積 (mm <sup>3</sup> )	
	对照溶液投与群 (n=10)	試料溶液投与群 (n=10)
7	190.5	115.6
10	539.2	228.0

【0029】次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0030】

【実施例】

実施例1

ペプチド自動合成装置(パーキン・エルマー社製、Model 433A)を使用し、シェパード等[ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティー・パーキンI (Journal of Chemical Society Perkin I)、第538ページ、1981年]による固相法、および同装置の使用説明書に基づいて抗腫瘍性ペプチドを次のとおり合成した。

【0031】ペプチド合成用固相樹脂としてHMP樹脂(パーキン・エルマー社製)500mg(0.25mm<sup>2</sup>)を使用し、前記ペプチド自動合成装置の合成プログラムにより脱保護基反応および縮合反応を反復してペプチド鎖を延長した。詳しくは、20%ピペリジン含有N-メチルピロリドン(パーキン・エルマー社製。以下、N-メチルピロリドンをNMPと略記する。)により、上記固相樹脂のアミノ保護基であるFmoc基を切断除去し、NMPで洗浄し、Fmoc-アミノ酸、具体的には、Fmoc-L-Arg(Pmc)-OH(パーキン・エルマー社製)を、FastMocリジェントキット(パーキン・エルマー社製、FastMocは登録商標)を使用して縮合させ、NMPで洗浄した。

【0032】以下、前記Fmoc基の切断、各Fmoc

-アミノ酸の縮合、および洗浄までの操作を反復した。

Fmoc-アミノ酸として、Fmoc-L-Pro-OH、Fmoc-L-Leu-OH、Fmoc-L-Val-OH、およびFmoc-L-Ala-OH(いずれもパーキン・エルマー社製)を順次使用した。ペプチド鎖の伸長反応が完了した後、20%ピペリジン含有NMPによりN末端のFmoc基を切断し、NMPおよびジクロロメタン(パーキン・エルマー社製)で洗浄し、真空乾燥して保護ペプチド樹脂を約513mg得た。

【0033】なお、縮合反応条件および脱保護条件は、フィードバックモニタリングシステムにより自動的に制御した。前記保護ペプチド樹脂510mgにエタンジオール(渡辺化学工業社製)0.5ml、結晶フェノール(東京化成工業社製)1.5g、チオアニソール(渡辺化学工業社製)1.0ml、および精製水1.0mlを添加して室温で15分間攪拌し、のち氷冷し、さらに10分間攪拌した。これにトリフルオロ酢酸(渡辺化学工業社製。以下、TFAと略記する。)20mlを添加して1.5時間攪拌し、グラスフィルターで樹脂を濾去し、濾液を直ちに減圧濃縮し、残渣に予め冷却した無水ジエチルエーテル(国産化学社製)を添加し、ペプチドを白色粉末化した。白色粉末化したペプチドを遠沈管に移し、冷ジエチルエーテルを新たに添加して十分攪拌し、遠心分離(2500rpmで10分間)し、上清を廃棄した。さらに冷ジエチルエーテルを新たに添加して十分攪拌し、遠心分離する操作を3回反復し、ペプチド

沈殿物を真空乾燥し、水に溶解して凍結乾燥し、粗製ペプチド約105mgを得た。

【0034】前記粗製ペプチドの全量を精製水に溶解し、遠心分離(15000rpmで5分間)し、上清を0.45 $\mu$ mフィルターで濾過し、この濾液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりペプチドの精製を行なった。HPLCは、ガリバーPU-986高圧グラジエントシステム(日本分光社製)を使用し、カラムは逆相系のLichrospher100RP-18(e) 250 $\times$ 10mm(メルク社製)を使用した。溶離液は0.1%TFA/精製水をA液、80%アセトニトリル/A液をB液とし、A液からB液への濃度直線勾配により溶出した。得られたクロマトグラムは、ほぼ単一のピークであり、ピークに相当する画分を分取した。この分取操作を数回反復し、得られた画分を凍結乾燥し、精製ペプチド約38.6mgを得た。分析用カラム[Lichrospher100RP-18(e) 250 $\times$ 4.6mm(メルク社製)]を使用し、得られた精製ペプチドのHPLC分析を行ない、精製物が単一であることを確認した。また、精製ペプチドのアミノ酸配列等を、常法のアミノ酸分析、アミノ酸配列分析、元素分析、質量分析により確認し、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有する5残基のアミノ酸配列からなるペプチドが得られていることを確認した。

【0035】この実施例で得られた精製ペプチドは、試験例に記載されるとおり、抗腫瘍活性を有していた。

#### 実施例2

固相樹脂として、HMP樹脂(パーキン・エルマー社製)500mg(0.25mmol)に変えてC末端アミド化ペプチド合成用固相樹脂であるFmocアミドレジジン(パーキン・エルマー社製)397mg(0.25mmol)を使用したことを除き、実施例1と同一の方法によりペプチド自動合成装置でC末端がアミド化された精製ペプチド誘導体約34.6mgを得た。

【0036】分析用カラム[Lichrospher100RP-18(e) 250 $\times$ 4.6mm(メルク社製)]を使用し、得られた精製ペプチド誘導体のHPLC分析を行ない、精製物が単一であることを確認した。また、精製ペプチドのアミノ酸配列等を、常法のアミノ酸分析、アミノ酸配列分析、元素分析、質量分析により確認し、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有する5残基のアミノ酸配列からなるC末端がアミド化されたペプチドの誘導体が得られていることを確認した。

【0037】この実施例で得られた精製ペプチドの誘導体は、試験例と同一の方法により抗腫瘍効果を試験した結果、有意な抗腫瘍活性を有することが確認された。

#### 実施例3

ペプチド合成用固相樹脂としてHMP樹脂(パーキン・エルマー社製)500mg(0.25mmol)を使用し、前記ペプチド自動合成装置の合成プログラムにより脱保護基反応および縮合反応を反復してペプチド鎖を延

長した。詳しくは、20%ピペリジン含有N-メチルピロリドン(パーキン・エルマー社製。以下、N-メチルピロリドンをNMPと略記する。)により、上記固相樹脂のアミノ保護基であるFmoc基を切断除去し、NMPで洗浄した後、Fmoc-アミノ酸、具体的には、Fmoc-L-Leu-OH(パーキン・エルマー社製)を、FastMocリージェントキット(パーキン・エルマー社製。FastMocは登録商標。)を使用して縮合させ、NMPで洗浄した。以下、前記Fmoc基の切断、各Fmoc-アミノ酸の縮合、および洗浄までの操作を反復した。

【0038】Fmoc-アミノ酸として、Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-L-Lys(OtBu)-OH、Fmoc-L-Ala-OH、Fmoc-L-Ser(tBu)-OH、Fmoc-L-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-L-Pro-OH、Fmoc-L-Leu-OH、Fmoc-L-Val-OHおよびFmoc-L-Ala-OH(いずれもパーキン・エルマー社製)を順次使用した。ペプチド鎖の伸長反応が完了した後、20%ピペリジン含有NMPによりN末端のFmoc基を切断し、NMPおよびジクロロメタン(パーキン・エルマー社製)で洗浄し、真空乾燥して保護ペプチド樹脂を約767mg得た。

【0039】なお、縮合反応条件および脱保護条件は、フィードバックモニタリングシステムにより自動的に制御した。前記保護ペプチド樹脂767mgにエタンジチオール(渡辺化学工業社製)0.5ml、結晶フェノール(東京化成工業社製)1.5g、チオアニソール(渡辺化学工業社製)1.0ml、および精製水1.0mlを添加して室温で15分間攪拌し、のち氷冷し、さらに10分間攪拌した。これにTFA20mlを添加して1.5時間攪拌し、ガラスフィルターで樹脂を濾去し、濾液を手早く減圧濃縮し、残渣に予め冷却した無水ジエチルエーテル(国産化学社製)を添加し、ペプチドを白色粉末化した。白色粉末化したペプチドを遠濾管に移し、冷ジエチルエーテルを新たに添加して十分攪拌し、遠心分離(2500rpmで10分間)し、上清を廃棄した。さらに冷ジエチルエーテルを新たに添加して十分攪拌し、遠心分離する操作を3回反復し、ペプチド沈殿物を真空乾燥し、水に溶解して凍結乾燥し、粗製ペプチド約231mgを得た。

【0040】前記粗製ペプチドの全量を精製水に溶解し、遠心分離(15000rpmで5分間)し、上清を0.45 $\mu$ mフィルターで濾過し、この濾液をHPLCによりペプチドの精製を行なった。HPLCは、ガリバーPU-986高圧グラジエントシステム(日本分光社製)を使用し、カラムは逆相系のLichrospher100RP-18(e) 250 $\times$ 10mm(メルク社製)を使用した。溶離液は0.1%TFA/精製水をA液、80%アセトニトリル/A液をB液とし、A液からB液への濃度直線勾配により溶出し



た。得られたクロマトグラムは、ほぼ単一のピークであり、ピークに相当する画分を分取した。この分取操作を数回反復し、得られた画分を凍結乾燥し、精製ペプチド約90mgを得た。分析用カラム[Lichrospher100RP-18(e) 250×4.6 mm (メルク社製)]を使用し、得られた精製ペプチドのHPLC分析を行ない、精製物が単一であることを確認した。また、精製ペプチドのアミノ酸配列等を、常法のアミノ酸分析、アミノ酸配列分析、元素分析、質量分析により確認し、配列番号2で表わされるアミノ酸配列を有する10残基のアミノ酸配列からなるペプチドが得られていることを確認した。

【0041】この実施例で得られた精製ペプチドは、試験例と同一の方法により抗腫瘍効果を試験した結果、有意な抗腫瘍活性を有することが確認された。

#### 実施例4

ペプチド合成用固相樹脂としてHMP樹脂(パーキン・エルマー社製)500mg(0.25mmol)を使用し、前記ペプチド自動合成装置の合成プログラムにより脱保護基反応および縮合反応を反復してペプチド鎖を延長した。詳しくは、20%ピペリジン含有N-メチルピロリドン(パーキン・エルマー社製。以下、N-メチルピロリドンをNMPと略記する。)により、上記固相樹脂のアミノ保護基であるFmoc基を切断除去し、NMPで洗浄した後、Fmoc-アミノ酸、具体的には、Fmoc-L-Lys(Boc)-OH(パーキン・エルマー社製)を、FastMocリジェントキット(パーキン・エルマー社製。FastMocは登録商標。)を使用して縮合させ、NMPで洗浄した。以下、前記Fmoc基の切断、各Fmoc-アミノ酸の縮合、および洗浄までの操作を反復した。

【0042】Fmoc-アミノ酸として、Fmoc-L-Ser(tBu)-OH、Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-L-Thr(tBu)-OH、Fmoc-L-Lys(Boc)-OH、Fmoc-L-Ile-OH、Fmoc-L-Cys(Trt)-OH、Fmoc-L-Gln(Trt)-OH、Fmoc-L-Cys(Trt)-OH、Fmoc-L-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-L-Leu-OH、Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-L-Lys(Boc)-OH、Fmoc-L-Ala-OH、Fmoc-L-Ser(tBu)-OH、Fmoc-L-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-L-Pro-OH、Fmoc-L-Leu-OH、Fmoc-L-Val-OHおよびFmoc-L-Ala-OH(いずれもパーキン・エルマー社製)を順次使用した。ペプチド鎖の伸長反応が完了した後、20%ピペリジン含有NMPによりN末端のFmoc基を切断し、NMPおよびジクロロメタン(パーキン・エルマー社製)で洗浄

し、真空乾燥して保護ペプチド樹脂を約1250mg得た。

【0043】なお、縮合反応条件および脱保護条件は、フィードバックモニタリングシステムにより自動的に制御した。前記保護ペプチド樹脂1250mgにエタンジチオール(渡辺化学工業社製)0.5ml、結晶フェノール(東京化成工業社製)1.5g、チオアニソール(渡辺化学工業社製)1.0ml、および精製水1.0mlを添加して室温で15分間攪拌し、のち氷冷し、さらに10分間攪拌した。これにTFA20mlを添加して1.5時間攪拌し、グラスフィルターで樹脂を濾し、濾液を手早く減圧濃縮し、残渣に予め冷却した無水ジエチルエーテル(国産化学社製)を添加し、ペプチドを白色粉末化した。白色粉末化したペプチドを遠沈管に移し、冷ジエチルエーテルを新たに添加して十分攪拌し、遠心分離(2500rpmで10分間)し、上清を廃棄した。さらに冷ジエチルエーテルを新たに添加して十分攪拌し、遠心分離する操作を3回反復し、ペプチド沈殿物を真空乾燥し、水に溶解して凍結乾燥し、粗製ペプチド約475mgを得た。

【0044】前記粗製ペプチドの全量を精製水に溶解し、遠心分離(15000rpmで5分間)し、上清を0.45μmフィルターで濾過し、この濾液をHPLCによりペプチドの精製を行なった。HPLCは、ガリバーPU-986高圧グラジエントシステム(日本分光社製)を使用し、カラムは逆相系のLichrospher100RP-18(e) 250×10mm(メルク社製)を使用した。溶離液は0.1% TFA/精製水をA液、80%アセトニトリル/A液をB液とし、A液からB液への濃度直線勾配により溶出した。得られたクロマトグラムは、ほぼ単一のピークであり、ピークに相当する画分を分取した。この分取操作を数回反復し、得られた画分を凍結乾燥し、精製ペプチド約140mgを得た。分析用カラム[Lichrospher100RP-18(e) 250×4.6 mm (メルク社製)]を使用し、得られた精製ペプチドのHPLC分析を行ない、精製物が単一であることを確認した。また、精製ペプチドのアミノ酸配列等を、常法のアミノ酸分析、アミノ酸配列分析、元素分析、質量分析により確認し、配列番号3で表わされるアミノ酸配列を有する20残基のアミノ酸配列からなるペプチドが得られていることを確認した。

【0045】この実施例で得られた精製ペプチドは、試験例と同一の方法により抗腫瘍効果を試験した結果、有意な抗腫瘍活性を有することが確認された。

#### 実施例5

次の組成の注射剤を常法により製造した。なお、抗腫瘍性ペプチド以外の成分はいずれも市販品である。

【0046】

実施例1と同一の方法により得た抗腫瘍性ペプチド  
塩化ナトリウム

0.5(重量%)

0.9

実施例6 注射用蒸留水 98.6  
 次の組成の注射剤を常法により製造した。なお、抗腫瘍性ペプチド以外の成分はいずれも市販品である。  
 【0047】  
 実施例2と同一の方法により得た抗腫瘍性ペプチド 0.5 (重量%)  
 アクチノマイシンD 0.005  
 塩化ナトリウム 0.9  
 注射用蒸留水 98.595

実施例7 品である。  
 1錠あたりの組成が次の組成の錠剤を常法により製造した。なお、抗腫瘍性ペプチド以外の成分はいずれも市販品である。  
 【0048】  
 実施例3と同一の方法により得た抗腫瘍性ペプチド 1.0 (mg)  
 アクチノマイシンD 0.02  
 乳糖 162.98  
 結晶セルロース 30.0  
 ポリビニルピロリドン 5.0  
 ステアリン酸マグネシウム 1.0

実施例8 品である。  
 1錠あたりの組成が次の組成の錠剤を常法により製造した。なお、抗腫瘍性ペプチド以外の成分はいずれも市販品である。  
 【0049】  
 実施例4と同一の方法により得た抗腫瘍性ペプチド 1.0 (mg)  
 結晶セルロース 50.0  
 コーンスターチ 40.0  
 ステアリン酸マグネシウム 1.0  
 ヒドロキシプロピルメチルセルロース 15.0  
 ポリエチレングリコール (分子量6000) 3.0  
 ヒマシ油 50.0  
 メタノール 40.0

## 【0050】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明によって、以下のとおりの効果を奏する新規な抗腫瘍剤が提供される。

- 1) 副作用が極めて少なく、熱に安定であり、少量で腫瘍細胞に対して選択的に抗腫瘍効果を示す。
- 2) 化学合成により安価に供給が可能であり、実用性が高い。
- 3) 従来の化学療法、放射線療法等の癌治療に伴う周囲組織の炎症反応を惹起することなく、抗腫瘍効果を有するという利点を有している。

## 【0051】

## 【配列表】

配列番号: 1  
 配列の長さ: 5  
 配列の型: アミノ酸  
 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Ala Val Leu Pro Arg

1 5

配列番号: 2

配列の長さ: 10

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu

1 5 10

配列番号: 3

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys

1 5 10 15

Thr Tyr Ser Lys

20

**TRANSLATION FROM JAPANESE**

- (19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)  
(12) Unexamined Patent Gazette (A)  
(11) Unexamined Patent Application (Kokai) No. 11-43445 [i.e., 1999-43445]  
(43) Disclosure Date: 16 February 1999  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

		Classification	F I	
		Symbols		
A 61 K	38/00	ADU	A 61 K 37/02	ADU
// C 07 K	7/06	ZNA	C 07 K 7/06	ZNA
	7/08		7/08	

Request for Examination: Not yet submitted      Number of Claims: 2

(Total of 8 pages [in original])

(21) Application No.: 9-200591 [i.e., 1997-200591]

(22) Filing Date: 25 July 1997

(71) Applicant: 000006127

Morinaga Milk Ind. Co., Ltd.

5-chome 33-ban 1-go Shiba, Minato-ku, Tokyo

(72) Inventor: Kiyohiko Hatake

2-chome 11-banchi 6-go Gion, Kawaramachi, Kawachi-gun, Tochigi  
Prefecture

(72) Inventor: Yasuhito Terui

E102, 3-chome 1-banchi 3-go Gion, Kawaramachi, Kawachi-gun, Tochigi  
Prefecture

(74) Agent: Toshio Nishizawa, Patent Attorney

(54) [ Title of the Invention ]      **Antitumor Agent**

(57) [ Summary ]

[ Object ] To provide an antitumor agent with extremely few side effects, that is thermally stable, and that has selective antitumor effects on tumor cells in small quantities.

[ Means ] An antitumor agent containing a peptide comprising 5 to 20 amino acids containing an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1, a derivative of the peptide, a

pharmacologically permissible salt of the peptide or its derivative, or a mixture thereof as an active ingredient.

[ Claims ]

[ Claim 1 ] An antitumor agent containing a peptide comprising 5 to 20 amino acids containing an amino acid sequence in SEQ NO: 1, a derivative of the peptide, a pharmacologically permissible salt of the peptide or its derivative, or a mixture thereof as an active ingredient.

[ Claim 2 ] The antitumor agent of Claim 1 containing at least 5 mg of active ingredients per 1 g of a final composition.

[ Detailed Description of the Invention ]

[ 0001 ]

[ Technological Field of the Invention ] The present invention relates to an antitumor agent. In greater detail, it relates to a new antitumor agent having propagation inhibitory effects on tumor cells, anticancer effects, cancer metastasis inhibitory effects, angiogenesis inhibitory effects, etc., and useful in the treatment of malignant tumors.

[ 0002 ]

[ Prior Art ] Conventionally, the main methods for the treatment of malignant tumors was early detection or surgical excision; however, for a site where a malignant tumor grows that is difficult to excise, or when there is metastasis to a site other than the site of origination or infiltration has occurred, treatment methods using radiation irradiation on the patient and regular administration of antitumor agents have been carried out.

[ 0003 ] Treatment methods with regular administration of antitumor agents can be generally classified into treatment methods using drug

- 1) immunostimulant effects
- 2) antimetabolite effects, and
- 3) effects to directly kill tumor cells.

[ 0004 ] Many drugs synthesized chemically are used in treatments using the effects in 2) and 3) above. Nevertheless, while these drugs have strong antitumor effects, they also have

the side effect of exhibiting poison towards not only tumor cells but normal cells as well. It has also been pointed out that there are few effective drugs for solid cancer, and that use of those drugs brings about multidrug resistance [*Gan-no baiosaiensu 4-gan-no atarashii shindan-to chiryo*<sup>1</sup>, ed. Yasuo Inoue, University of Tokyo Press (1991): 10].

[ 0005 ] Treatment methods using the effects of 1) above activate the biological immune system and boost immune functions against tumors by using BRMs (biological response modifiers), which strengthen the biological response against tumors. In greater detail, attempts such as administering interleukins, cytokines, basidiomycete constituents (such schizophyllan and lentinan) and the like as BRMs to activate macrophages and lymphocytes having antitumor effects, as well as administering tumor necrosis factors (TNF) having antitumor effects are being made, and clinical research is being carried out in conjunction with the use of chemically synthesized drugs having the effects in 2) and 3) above [*Ikei menekigaku*<sup>2</sup>, Junichi Yada, Chugaiigaku Co., (1989): 325].

[ 0006 ] Active ingredients in conventional antitumor agents that are known include alkylating agents [for example, cyclophosphamide and the like: *Cancer Research* 21 (1961): 1412] which inactivate nucleic acid and protein through alkylation, nucleic acid synthesis inhibitors [for example, 5-fluorouracil and the like: *Cancer* 45 (1980): 1129], and some antibiotics [for example, actinomycin D and the like: *Journal of Immunology* 145 (1990): 1859].

[ 0007 ] Also, polypeptides having antitumor effects that are known include human interferon  $\gamma$  polypeptides (Unexamined Patent Application Publication Number 5-320200 [i.e., 1993-320200]), human tumor necrosis factors (TNF) and polypeptides made from some recombinants thereof (Unexamined Patent Application Publication Number 5-271290 [i.e., 1993-271290], Unexamined Patent Application Publication Number 5-271289 [i.e., 1993-271289], Unexamined Patent Application Publication Number 5-255393 [i.e., 1993-255393], Unexamined Patent Application Publication Number 5-271287 [i.e., 1993-271287], Unexamined Patent Application Publication Number 4-368398 [i.e., 1992-

---

<sup>1</sup> [Translator's note: This could be translated as *Cancer Bioscience 4 New Cancer Diagnoses and Treatments.*]

368398], Unexamined Patent Application Publication Number 4-368397 [i.e., 1992-368397], Unexamined Patent Application Publication Number 4-327599 [i.e., 1992-327599], Unexamined Patent Application Publication Number 3-180194 [i.e., 1991-180194], Unexamined Patent Application Publication Number 3-180193 [i.e., 1991-180193], Unexamined Patent Application Publication Number 3-98587 [i.e., 1991-98587], Unexamined Patent Application Publication Number 3-65196 [i.e., 1991-65196], Unexamined Patent Application Publication Number 3-65195 [i.e., 1991-65195], Unexamined Patent Application Publication Number 3-61495 [i.e., 1991-61495], Unexamined Patent Application Publication Number 3-30693 [i.e., 1991-30693], Unexamined Patent Application Publication Number 2-72122 [i.e., 1990-72122], Unexamined Patent Application Publication Number 2-255096 [i.e., 1990-255096], Unexamined Patent Application Publication Number 2-177896 [i.e., 1990-177896], Unexamined Patent Application Publication Number 2-163094 [i.e., 1990-163094], Unexamined Patent Application Publication Number 2-145188 [i.e., 1990-145188], Unexamined Patent Application Publication Number 2-86793 [i.e., 1990-86793], Unexamined Patent Application Publication Number 1-277488 [i.e., 1989-277488], Unexamined Patent Application Publication Number 1-85095 [i.e., 1989-85095], Unexamined Patent Application Publication Number 1-85094 [i.e., 1989-85094], Unexamined Patent Application Publication Number 1-47393 [i.e., 1989-47393], Unexamined Patent Application Publication Number 1-30596 [i.e., 1989-30596], Unexamined Patent Application Publication Number 1-30595 [i.e., 1989-30595], Unexamined Patent Application Publication Number 2-9389 [i.e., 1990-9389], Unexamined Patent Application Publication Number 63-279799 [i.e., 1988-279799], Unexamined Patent Application Publication Number 63-267290 [i.e., 1988-267290], Unexamined Patent Application Publication Number 63-198996 [i.e., 1988-198996], Unexamined Patent Application Publication Number 63-141999 [i.e., 1988-141999], Unexamined Patent Application Publication Number 63-32486 [i.e., 1988-32486], Unexamined Patent

---

<sup>2</sup> [Translator's note: This could be translated as *Medical Immunology*.]

Application Publication Number 62-272991 [i.e., 1987-272991], Unexamined Patent Application Publication Number 62-248498 [i.e., 1987-248498], Unexamined Patent Application Publication Number 62-48632 [i.e., 1987-48632], and Unexamined Patent Application Publication Number 61-280437 [i.e., 1986-280437]), cyclic peptide compounds having specific amino sequences extracted from *Rubia cordifolia* (Unexamined Patent Application Publication Number 5-262794 [i.e., 1993-262794] and Unexamined Patent Application Publication Number 5-32698 [i.e., 1993-32698]), polypeptides having human interleukin 2 activity (Unexamined Patent Application Publication Number 5-502876 [i.e., 1993-502876]), human interleukin 1 $\alpha$  polypeptides (Unexamined Patent Application Publication Number 4-330282 [i.e., 1992-330282]), LHRH analogs controlling the release of gonadotropin from the pituitary and having antineoplastic activity (Unexamined Patent Application Publication Number 4-224600 [i.e., 1992-224600]), somatostatin analogs (Unexamined Patent Application Publication Number 6-41194 [i.e., 1994-41194]), transforming growth factor  $\beta$ -2 and peptides made from some homologs thereof (Unexamined Patent Application Publication Number 1-63395 [i.e., 1989-63395]), polypeptides obtained from protein components extracted from plant seeds (Unexamined Patent Application Publication Number 1-75430 [i.e., 1989-75430]), type I interferon peptides (Unexamined Patent Application Publication Number 61-18138 [i.e., 1986-18138]), polypeptides produced from human histiocytic lymphoma derived cell strains (Unexamined Patent Application Publication Number 61-280431 [i.e., 1986-280431]), polypeptides produced by microorganisms of the genus *Streptomyces* (Unexamined Patent Application Publication Number 61-271991 [i.e., 1986-271991]), human interleukin-2 polypeptide derivatives (Unexamined Patent Application Publication Number 61-225199 [i.e., 1986-225199]), saframycin A derivatives (Unexamined Patent Application Publication Number 61-58593 [i.e., 1986-58593]), human immune interferon (Unexamined Patent Application Publication Number 58-189197 [i.e., 1983-189197]), human fibroblast interferon (Unexamined Patent Application Publication Number 57-140793 [i.e., 1982-

140793)), and polypeptides containing at least 2-amino-3-guanide propionic acid (Unexamined Patent Application Publication Number 56-147796 [i.e., 1981-147796]).

[ 0008 ]

[ Problems to be Solved by the Invention ] As mentioned above, polypeptides and the like showing antitumor activity are known conventionally, but such polypeptides and the like had the problem that antigenicity, thermal stability and chemical synthesis were difficult. Thus, an antitumor agent has been desired that does not exhibit side effects such as antigenicity while being thermally stable, and in particular which selectively acts on tumor cells and does not induce harmful inflammatory reactions in the surrounding tissue. The development of a peptide that is inexpensive, and can be supplied through chemical synthesis, and that has low molecular antitumor activity with high practicality has been hoped for.

[ 0009 ] The invention was devised as a reflection of the above situation; it has extremely few side effects and is thermally stable, and it is an object of the invention to supply an antitumor agent containing a peptide that acts selectively on tumor cells. Also, the invention is inexpensive, and it is an object of the invention to provide an antitumor agent with high practicality which can be supplied using chemical synthesis.

[ 0010 ]

[ Means to Solve the Problems ] The invention was devised to solve the aforementioned problems, and provides an antitumor agent containing a peptide comprising 5 to 20 amino acids containing an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1, a derivative of the peptide, a pharmacologically permissible salt of the peptide or its derivative, or a mixture thereof as an active ingredient.

[ 0011 ] Also, the antitumor agent of the invention has a favorable mode containing at least 5 mg of active ingredients per 1 g of a final composition.

[ 0012 ]

[ Embodiments of the Invention ] A peptide, being an active ingredient in the antitumor agent of the present invention (hereinafter, noted as an antitumor peptide), comprises 5



amino acid residues listed in SEQ ID NO: 1, or up to 20 residues containing an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1. These antitumor peptides can be chemically synthesized as follows using a publicly known solid phase method, liquid phase method or the like.

[ 0013 ] With the solid phase method, a solid phase resin for peptide synthesis is used to synthesize a desired antitumor peptide by successively condensing amino acid blocks to lengthen peptide chains. Amino acid derivatives protected by a reactive group on the N terminal or side chain reactive group with a protecting group such as 9-

Fluorenylmethoxycarbonyl (hereinafter, abbreviated to Fmoc) as the amino acid block are used to synthesize the object peptide chain by repeating condensation reactions from the C terminal and deprotection reactions on the N terminal side. Next, the peptide protected by the N-terminal or side chain reactive group is removed from the resin by cutting, and a deprotection reaction is carried out to obtain the object antitumor peptide.

[ 0014 ] The aforementioned operation can be carried out using a mechanized or automated peptide automatic synthesizer (for example, the Perkin Elmer 433A, etc.) With the liquid phase method, on the other hand, an amino acid derivative protected by a protecting group at the N terminal, C terminal or side chain reactive group is used as an amino acid block to synthesize the desired antitumor peptide chain by repeating condensation reactions, and N terminal or C terminal deprotection reactions. Further, instead of the consecutive chain length lengthening method in the liquid phase method for successively lengthening the peptide chain from the C terminal end or N terminal end, the object peptide chain can be broken into suitable fragments, and after synthesizing a fragment chain for each, a fragment method can be applied to condense the fragment chains and synthesize the object peptide chain.

[ 0015 ] The antitumor peptide derivative, an active ingredient in the antitumor agent of the present invention, is a derivative of an addition compound or partial substitute of an antitumor peptide chemically synthesized using the aforementioned methods; and the antitumor peptide derivative for which the C terminal has been aminated or acylated can be exemplified. For example, when using the solid phase method to synthesize an antitumor

peptide derivative whose C terminal has been aminated, as mentioned above, the peptide whose N terminal or side chain reactive group is protected is removed from the resin by cutting, amination of the peptide's C terminal is carried out, and protective reactions are further carried out so the object antitumor peptide derivative can be obtained.

[ 0016 ] Also, when synthesizing a peptide derivative whose C terminal has been aminated, a solid phase resin (such as, for example, Perkin Elmer's Fmoc amide resin) for C terminal amide peptide synthesis may be used instead of the conventional solid phase resin. In this case, it is convenient to carry out the deresination or deprotection at the same time using protection group selection.

[ 0017 ] Pharmacologically allowed salts of the antitumor peptide, which is an active ingredient for antitumors [sic] of the invention, as well as of its derivative are non-toxic, and in concrete terms, may be an acid additive salt, metal complex, carboxylate or the like. The acid additive salt may be exemplified with hydrochloride, hydrobromide, hydrosulfate, phosphate, tannate, oxalate, fumarate, gluconate, alginate, maleate, acetate, trifluoroacetate, citrate, benzoate, succinate, malate, ascorbate, tartrate or the like. Also, the metal complex may be exemplified with, for example, complexes of zinc, iron, calcium, magnesium, aluminum, and the like. Further, the carboxylate may be exemplified with, for example, an alkaline metal and its sodium, potassium or other such salt, an alkaline earth metal and its potassium, magnesium or other such salt, and ammonium salt or the like.

[ 0018 ] For the antitumor agent of the invention, an antitumor peptide, antitumor peptide derivative, one type of compound or two or more compounds arbitrarily selected from a salt pharmacologically allowed of an antitumor peptide or its derivative (hereinafter, these are collectively noted as "peptides") may be included as active ingredients at a concentration of 5 mg/kg or higher, and prepared along with the other ingredients. The other ingredients may be exemplified with fillers, extenders, binders, humidifying agent, disintegrants, surfactants, diluents for lubricants, diluents and the like ordinarily used in medical manufacturing fields.

[ 0019 ] The antitumor agent of the invention can be administered to humans or animals through general medical preparation forms, for example, intravenous injection,

subcutaneous injection or orally, and the form of the agent may be selected according to the administration route or the purpose of treatment. Typical exemplifications include tablets, pills, powders, liquids, suspension agents, emulsions, granulated powders, capsules, suppositories, injectables (liquid, suspension agent, etc.), or the like. For example, when forming a tablet, a diluent such as lactose, sucrose, sodium chloride, glucose, urea, starch, calcium carbonate, kaolin, crystalline cellulose, or silicic acid; a binder such as water, ethanol, propanol, simple syrup, glucose solution, starch solution, gelatin solution, carboxymethylcellulose, methylcellulose, potassium phosphate, or polyvinyl pyrrolidone; a disintegrator such as dried starch, agar powder, laminaran powder, sodium bicarbonate, calcium carbonate, polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester, sodium lauryl sulfate, monoglyceride stearate, starch, or lactose; a disintegration inhibitor such as sucrose, stearin, cacao butter, or hydrogenated oil; an absorption promoter such as quaternary ammonium base or sodium lauryl sulfate; a humectant such as glycerol or starch; an adsorbent such as starch, lactose, kaolin, bentonite, or colloidal silicic acid; and a lubricant such as purified talc, stearate, boric acid powder, or polyethylene glycol may be arbitrarily used. Also, the tablet may take the form of a coated tablet covered with any conventional coating or film as required, for example, a sugar-coated tablet, gelatin-coated tablet, enteric coated tablet or a film-coated tablet, or a double-layered or multi-layered tablet.

[ 0020 ] When preparing an injectable, it is desirable that a liquid, emulsion or suspension liquid be sterilized and be isotonic with blood; for a diluent, water, ethyl alcohol, propylene glycol, isostearyl alcohol ethoxylate, isostearyl alcohol polyoxalate, polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester, and the like, for example, may be used. In this case, it is possible to include an adequate quantity of table salt, glucose, glycerine and the like to prepare an isotonic solution; it is also possible to blend in a solubilizing agent, buffer agent, analgesic agent or the like.

[ 0021 ] Medical preparations in these forms may be further blended with a commonly used coloring agent, preservative, fragrant, flavoring agent, sweetening agent or the like according to need, and may also include other active pharmaceutical ingredients. The

antitumor agent of the invention may further be used along with other antitumor agents according to need, for example, publicly known cancer drugs as a form of cancer chemotherapy, and may also be used along with radiation therapy. Thus, superior anticancer effects may be accomplished with the antitumor agent of the invention, so the effects of other cancer drugs used in conjunction may be extended one level further, and it is possible to bring about synergistic effects. Even when the amount of cancer drugs used in conjunction is less than the amount normally used, adequate cancer treatment effects can be obtained, so the side effects of the cancer drugs used in conjunction may thus be reduced.

[ 0022 ] With subcutaneous administration, it has been determined from test results using mice that a useful dosage of the antitumor agent of the invention is at least 1 mg/kg of body weight/day. The result of acute toxicity testing of intravenous administration using mice is that peptides, an active ingredient in the antitumor agent of the invention, have extremely low toxicity, a LD<sub>50</sub> of 100 mg/kg of bodyweight or higher, and may be used on humans and animals safely and with extremely small side effects.

[ 0023 ] The antitumor agent of the invention is useful as a cancer drug, a cancer metastasis inhibitor or an angiogenesis inhibitor. Next, a sample test will be exhibited to describe results of the invention in detail.

#### Sample Test

This test was carried out to study whether the antitumor agent of the invention has effects inhibiting the propagation of tumor cells.

##### (1) Preparation of the sample

An antitumor peptide having an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1 chemically synthesized using the same method as in Embodiment 1 was dissolved in a physiological saline (*Seiri Shokuen-chu*, manufactured by Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) at a concentration of 0.3 mg/ml, and this was heated for 24 hours at 60° C after which it was cooled and used as a sample solution. A physiological saline not containing an antitumor peptide was treated similarly and used as a control solution.

##### (2) Test method

The testing was carried out as follows based on the method of Kyriazis, et al, in the *American Journal of Pathology* 106 (1982): 250.

[ 0024 ] Human erythroblastic leukemia cells (K562) were dispersed in Dulbecco's phosphate buffered saline [Journal of Experimental Medicine 99 (1954): 167 – 182] at a ratio of  $5 \times 10^6$  cells/ml, and 0.1 ml of the cell dispersion liquid was transplanted into the back skin of 20 5-month-old nude male mice (Balb/c nu/nu, purchased from Charles River Japan, Inc.) raised for 1 week in advance.

[ 0025 ] The transplant mice were raised for 4 days using a conventional method, the formation of tumors in each mouse was checked, the mice were randomly divided into 10 per group, 0.1 ml of the sample solution was administered daily intratumorally once per day into one group, and the control solution into the other group, the long diameter and short diameter of each tumor were measured with a slide gauge 7 days and 10 days after the cell transplant, and the volume of the tumor was calculated with the following formula.

[ 0026 ]

$$\text{Volume of tumor (mm}^3\text{)} = \text{short diameter}^2 \times \text{long diameter} \times 0.4$$

The human erythroblastic leukemia cells (K562) used in the test were from a publicly known human leukemia strain [*Blood* 45 (1979): 321 – 322], and the cells were consigned from American Type Culture Collection: ATCC as consignment number ATCC No. CCL-243, readily available.

### (3) Test results

The results of the test are shown in Table 1. Table 1 shows the average tumor surface area [sic] of each group of 10 mice. As is clear from Table 1, the volume of the tumors of the group administered with the sample solution containing the antitumor agent of the invention compared to the group administered with the control solution is approximately 3/5 after 7 days, and less than approximately 1/2 after 10 days. These results confirmed that the antitumor agent of the invention significantly controls the propagation of K562 cells, and has prominent antitumor effects. The antitumor effects were also confirmed after the

heating for 24 hours at 60° C, proving that the antitumor agent of the invention is thermally stable.

[ 0027 ] Tests were carried out using other peptides as well, and similar effects were obtained.

[ 0028 ]

[ Table 1 ]

Number of days after transplant	Average volume of tumor (mm <sup>3</sup> )	
	Group administered with control solution (n = 10)	Group administered with sample solution (n = 10)
7	190.5	115.6
10	539.2	228.0

[ 0029 ] Embodiments are next exhibited to describe the invention concretely and in further detail, but the invention is not limited to the below embodiments.

[ 0030 ]

[ Embodiments ]

Embodiment 1

An automatic peptide synthesizer (model 433A manufactured by Perkin Elmer) was used to synthesize antitumor peptides based on the solid phase method of Shepard [spelling unknown], et al, [Journal of Chemical Society Perkin I (1981): 538] and on the user's manual for the synthesizer as follows.

[ 0031 ] 500 mg (0.25 mmol) of HMP resin (manufactured by Perkin Elmer) were used as solid phase resin for peptide synthesis to lengthen the peptide chains by repeating deprotection group reactions and condensation reactions using a synthesis program of the aforementioned automatic peptide synthesizer. In greater detail, N-methyl pyrrolidone (manufactured by Perkin Elmer; N-methyl pyrrolidone is abbreviated as NMP below) containing 20% piperidine was used to remove the amino protecting group Fmoc from the aforementioned solid phase resin by cutting, this was washed with NMP, the Fmoc-amino acid, or in concrete detail, Fmoc-L-Arg (Pmc)-OH (manufactured by Perkin Elmer), was

condensed using a FastMoc Regent Kit (manufactured by Perkin Elmer; FastMoc is a registered trademark), and this was washed with NMP.

[ 0032 ] Below, the aforementioned operation from the cutting of the Fmoc group and condensation of the Fmoc-amino acid through the washing was repeated. Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Val-OH and Fmoc-L-Ala-OH (all manufactured by Perkin Elmer) were successively used as Fmoc-amino acids. After the peptide chain extension reaction was complete, the Fmoc group at the N terminal was cut with NMP containing 20% piperidine, and this was washed with NMP and dichloromethane (manufactured by Perkin Elmer), yielding approximately 513 mg of protection peptide resin after vacuum drying.

[ 0033 ] The condensation reaction conditions and deprotection conditions were automatically controlled using a feedback monitoring system. 0.5 ml of ethanedithiol (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.), 1.5 g of crystal phenol (manufactured by Tokyo Kasei Co., Ltd.), 1.0 ml of thioanisole (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.), and 1.0 ml of purified water were added to the aforementioned 510 mg of protective peptide resin, this was agitated for 15 minutes at room temperature, and agitated for 10 minutes further after chilling. 20 ml of trifluoroacetic acid (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.) were added thereto and this was agitated for 1.5 hours; the resin was filtered through a glass filter, the filtered liquid was immediately vacuum concentrated, and pre-cooled anhydrous diethyl ether (manufactured by Kokusan Chemical Works, Ltd.) was added to the residue, and the peptide was white powdered. The white powdered peptide was transferred to a centrifuge tube, the cooled diethyl ether was newly added and the result adequately agitated, this was centrifuged (10 minutes at 2500 rpm), and the supernatant was discarded. Cooled diethyl ether was newly added yet again and the result was adequately agitated, an operation for centrifuging was carried out three times, the peptide precipitate was vacuum dried, and this was dissolved in water and freeze dried to yield approximately 105 g of crude peptide.

[ 0034 ] All of the aforementioned crude peptide was dissolved in purified water and centrifuged (for 5 minutes at 15,000 rpm), the supernatant was filtered through a 0.45  $\mu$ m filter, and peptide purification of the filtered liquid was carried out using high performance liquid chromatography (HPLC). A Gulliver-PU-986 high pressure gradient system (manufactured by JASCO Corp.) was used for the HPLC, and 250  $\times$  10 mm reverse phase Lichrospher 100RP-18 (e) columns (manufactured by Merck, Ltd.) were used. The eluent was eluted using a linear concentration gradient from liquid A to liquid B where liquid A was 0.1% TFA/purified water and liquid B was 80% acetonitrile/liquid A. The obtained chromatograph had nearly a single peak, and the fraction corresponding to the peak was collected. The collection operation was repeated several times, and the obtained fractions were freeze dried to obtain approximately 38.6 mg of purified peptide. Analysis columns [250  $\times$  4.6 mm Lichrospher 100 RP-18(e) (manufactured by Merck)] were used to carry out an HPLC analysis of the obtained purified peptide, and it was confirmed that the purified material was singular. The purified peptide amino acid sequence, etc., was confirmed with ordinary amino acid analysis, amino acid sequence analysis, elemental analysis and mass spectrometry, and it was confirmed that a peptide comprising 5 amino acid residues having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 had been obtained

[ 0035 ] The purified peptide obtained in this Embodiment has antitumor activity as noted in the Sample Test.

#### Embodiment 2

With the exception of using 397 mg (0.25 mmol) of Fmoc amide resin (manufactured by Perkin Elmer), a solid phase resin for peptide synthesis whose C terminal was amidated, instead of the 500 mg (0.25 mmol) of HMP resin (manufactured by Perkin Elmer), approximately 34.6 mg of purified peptide derivative whose C terminal was amidated were obtained as a solid phase resin with the automatic peptide synthesizer using a method identical to that in Embodiment 1.

[ 0036 ] Analysis columns [250  $\times$  4.6 mm Lichrospher 100 RP-18(e) (manufactured by Merck, Ltd.)] were used to carry out an HPLC analysis of the obtained purified peptide



derivative, confirming that the purified material was singular. The purified peptide amino acid sequence, etc., was also confirmed with ordinary amino acid analysis, amino acid sequence analysis, elemental analysis and mass spectrometry, and it was also confirmed that a derivate of the peptide whose C terminal was amidated comprising 5 amino acid residues having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 was obtained.

[ 0037 ] The antitumor effects of the purified peptide derivative obtained in this Embodiment were tested using the same method as in the Sample Test, and the results confirmed the presence of significant antitumor activity.

#### Embodiment 3

500 mg (0.25 mmol) of HMP resin (manufactured by Elmer Perkin) were used as the solid resin for peptide synthesis to lengthen the peptide chain was lengthened by repeating deprotection reactions and condensation reactions using the synthesis program in the aforementioned automatic peptide synthesizer. In greater detail, N-methyl pyrrolidone (manufactured by Perkin Elmer; N-methyl pyrrolidone is hereinafter abbreviated as NMP) containing 20% piperidine was used to remove the amino protecting group Fmoc from the aforementioned solid phase resin by cutting, and after washing with NMP, Fmoc-amino acid, or in more concrete terms, Fmoc-L-Leu-OH (manufactured by Perkin Elmer), was condensed using a FastMoc reagent kit (manufactured by Perkin Elmer; FastMoc is a registered trademark), and this was washed with NMP. Below, the aforementioned operation of Fmoc group cutting, condensing each Fmoc-amino acid and washing was repeated.

[ 0038 ] Fmoc-L-Glu (OtBu)-OH, Fmoc-L-Lys (OtBu)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Ser (tBu)-OH, Fmoc-L-Arg (Pmc)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Val-OH and Fmoc-L-Ala-OH (all manufactured by Perkin Elmer) were successively used as Fmoc-amino acids. After the peptide chain extension reaction was complete, the Fmoc group at the N terminal was cut with NMP containing 20% piperidine, and this was washed with NMP and dichloromethane (manufactured by Perkin Elmer), yielding approximately 767 mg of protection peptide resin after vacuum drying.

[ 0039 ] The condensation reaction conditions and deprotection conditions were automatically controlled using a feedback monitoring system. 0.5 ml of ethanedithiol (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.), 1.5 g of crystal phenol (manufactured by Tokyo Kasei Co., Ltd.), 1.0 ml of thioanisole (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.), and 1.0 ml of purified water were added to the aforementioned 767 mg of protective peptide resin, this was agitated for 15 minutes at room temperature, and agitated for 10 minutes further after chilling. 20 ml of TFA were added to the result and this was agitated for 1.5 hours; the resin was filtered through a glass filter, the filtered liquid was rapidly vacuum concentrated, pre-cooled anhydrous diethyl ether (manufactured by Kokusan Chemical Works, Ltd.) was added to the residue, and the peptide was white powdered. The white powdered peptide was transferred to a centrifuge tube, the cooled diethyl ether was newly added and the result adequately agitated, this was centrifuged (10 minutes at 2500 rpm), and the supernatant was discarded. Cooled diethyl ether was newly added yet again and the result was adequately agitated, an operation for centrifuging was carried out three times, the peptide precipitate was vacuum dried, and this was dissolved in water and freeze dried to yield approximately 231 g of crude peptide.

[ 0040 ] All of the aforementioned crude peptide was dissolved in purified water and centrifuged (for 5 minutes at 15,000 rpm), the supernatant was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  filter, and peptide purification of the filtered liquid was carried out using HPLC. A Gulliver-PU-986 high pressure gradient system (manufactured by JASCO Corp.) was used for the HPLC, and 250  $\times$  10 mm reverse phase Lichrospher 100RP-18 (e) columns (manufactured by Merck, Ltd.) were used. The eluent was eluted using a linear concentration gradient from liquid A to liquid B where liquid A was 0.1% TFA/purified water and liquid B was 80% acetonitrile/liquid A. The obtained chromatograph had nearly a single peak, and the fraction corresponding to the peak was collected. The collection operation was repeated several times, and the collected fractions were freeze dried to obtain approximately 90 mg of purified peptide. Analysis columns [250  $\times$  4.6 mm Lichrospher 100 RP-18(e) (manufactured by Merck)] were used to carry out an HPLC analysis of the

obtained purified peptide, and it was confirmed that the purified material was singular. The purified peptide amino acid sequence, etc., was confirmed with ordinary amino acid analysis, amino acid sequence analysis, elemental analysis and mass spectrometry, and it was confirmed that a peptide was obtained comprising 10 amino acid residues having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

[ 0041 ] The results of testing the antitumor effects with the same method as in the Sample Test confirmed that the purified peptide obtained in this Embodiment has significant antitumor activity.

#### Embodiment 4

500 mg (0.25 mmol) of HMP resin (manufactured by Elmer Perkin) were used as the solid phase resin for peptide synthesis to lengthen the peptide chain by repeating deprotection reactions and condensation reactions using the synthesis program in the aforementioned automatic peptide synthesizer. In greater detail, N-methyl pyrrolidone (manufactured by Perkin Elmer; N-methyl pyrrolidone is hereinafter abbreviated as NMP) containing 20% piperidine was used to remove the amino protecting group Fmoc from the aforementioned solid phase resin by cutting, and after washing with NMP, Fmoc-amino acid, or in more concrete terms, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH (manufactured by Perkin Elmer) was condensed using a FastMoc reagent kit (manufactured by Perkin Elmer; FastMoc is a registered trademark), and this was washed with NMP. Below, the aforementioned operation of Fmoc group cutting, condensing each Fmoc-amino acid and washing was repeated.

[ 0038 ] Fmoc-L-Ser (tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-L-Thr (tBu)-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Cys (Trt)-OH, Fmoc-L-Gln (Trt)-OH, Fmoc-L-Cys (Trt)-OH, Fmoc-L-Arg (Pmc)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu (OtBu)-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Ser (tBu)-OH, Fmoc-L-Arg (Pmc)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Val-OH and Fmoc-L-Ala-OH (all manufactured by Perkin Elmer) were successively used as Fmoc-amino acids. After the peptide chain extension reaction was complete, the Fmoc group at the N terminal was cut with NMP containing 20% piperidine, and this was washed with NMP and dichloromethane

(manufactured by Perkin Elmer), yielding approximately 1250 mg of protection peptide resin after vacuum drying.

[ 0043 ] The condensation reaction conditions and deprotection conditions were automatically controlled using a feedback monitoring system. 0.5 ml of ethanedithiol (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.), 1.5 g of crystal phenol (manufactured by Tokyo Kasei Co., Ltd.), 1.0 ml of thioanisole (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.), and 1.0 ml of purified water were added to the aforementioned 1250 mg of protective peptide resin, this was agitated for 15 minutes at room temperature, and agitated for 10 minutes further after chilling. 20 ml of TFA were added to the result and this was agitated for 1.5 hours; the resin was filtered through a glass filter, the filtered liquid was rapidly vacuum concentrated, and pre-cooled anhydrous diethyl ether (manufactured by Kokusan Chemical Works, Ltd.) was added to the residue, and the peptide was white powdered. The white powdered peptide was transferred to a centrifuge tube, the cooled diethyl ether was newly added and the result adequately agitated, this was centrifuged (10 minutes at 2500 rpm), and the supernatant was discarded. Cooled diethyl ether was newly added yet again and the result was adequately agitated, an operation for centrifuging was carried out three times, the peptide precipitate was vacuum dried, and this was dissolved in water and freeze dried to yield approximately 475 g of crude peptide.

[ 0044 ] All of the aforementioned crude peptide was dissolved in purified water and centrifuged (for 5 minutes at 15,000 rpm), the supernatant was filtered through a 0.45  $\mu$ m filter, and peptide purification of the filtered liquid was carried out using HPLC. A Gulliver-PU-986 high pressure gradient system (manufactured by JASCO Corp.) was used for the HPLC, and 250  $\times$  10 mm reverse phase Lichrospher 100RP-18 (e) columns (manufactured by Merck, Ltd.) were used. The eluent was eluted using a linear concentration gradient from liquid A to liquid B where liquid A was 0.1% TFA/purified water and liquid B was 80% acetonitrile/liquid A. The obtained chromatograph had nearly a single peak, and the fraction corresponding to the peak was collected. The collection operation was repeated several times, and the obtained fractions were freeze dried to obtain

approximately 140 mg of purified peptide. Analysis columns [250 × 4.6 mm Lichrospher 100 RP-18(e) (manufactured by Merck)] were used to carry out an HPLC analysis of the obtained purified peptide, and it was confirmed that the purified material was singular. The purified peptide amino acid sequence, etc., was confirmed with ordinary amino acid analysis, amino acid sequence analysis, elemental analysis and mass spectrometry, and it was confirmed that a peptide was obtained comprising 20 amino acid residues having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3.

[ 0045 ] The results of testing the antitumor effects with the same method as in the Sample Test confirmed that the purified peptide obtained in this Embodiment has significant antitumor activity.

#### Embodiment 5

The injectable with the following composition was manufactured using an ordinary method. All of the ingredients other than the antitumor peptide were commercially available products.

[ 0046 ]

Antitumor peptide obtained using a method identical to that in Embodiment 10.5 (weight %)

Sodium chloride	0.9
Distilled water for injection	98.6

#### Embodiment 6

The injectable solution with the following composition was manufactured using an ordinary method. All of the ingredients other than the antitumor peptide were commercially available products.

[ 0047 ]

Antitumor peptide obtained using a method identical to that in Embodiment 20.5 (weight %)

Actinomycin D	0.005
Sodium chloride	0.9

Distilled water for injection	98.595
-------------------------------	--------

#### Embodiment 7

The injectable solution with the following composition was manufactured using an ordinary method. All of the ingredients other than the antitumor peptide were commercially available products.

[ 0048 ]

Antitumor peptide obtained using a method identical to that in Embodiment 3 1.0 (mg)

Actinomycin D	0.02
Lactose	162.98
Crystal cellulose	30.0
Polyvinyl pyrrolidone	5.0
Magnesium stearate	1.0

#### Embodiment 8

The injectable solution with the following composition was manufactured using an ordinary method. All of the ingredients other than the antitumor peptide were commercially available products.

[ 0049 ]

Antitumor peptide obtained using a method identical to that in Embodiment 4 1.0 (mg)

Crystal cellulose	50.0
Corn starch	40.0
Magnesium stearate	1.0
Hydroxypropyl methylcellulose	15.0
Polyvinyl glycol (molecular weight 6000)	3.0
Ricinus oil	50.0
Methanol	40.0

[ 0050 ]

[ Effects of the Invention ] As described above in detail, according the invention, a novel antitumor agent is provided accomplishing the effects mentioned below.

- 1) There are extremely few side effects, it is thermally stable, and antitumor effects are shown in small quantities that select for tumor cells.
- 2) It can be provided inexpensively through chemical synthesis, and it has high practicality.
- 3) It has the advantage of having antitumor effects while not causing inflammatory reactions in surrounding tissue in conjunction with conventional chemotherapy, radiation therapy, or the like.

[ 0051 ]

[ Sequence Listing ]

SEQ ID NO: 1

Length: 5

Type: Amino acid

Topology: Linear

Molecule type: Peptide

Sequence:

Ala Val Leu Pro Arg

1                      5

SEQ ID NO: 2

Length: 10

Type: Amino acid

Topology: Linear

Molecule type: Peptide

Sequence:

Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu

1                      5                      10

SEQ ID NO: 3

Length: 20

Type: Amino acid

Topology: Linear

Molecule type: Peptide

Sequence

Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys

1

5

10

15

20